

**Der Einfluß der Ernährung auf die Trypsinbildung
im Pankreas von Ratten.**

Georg Maier



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Chirurgischen Klinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. med. R. Z e n k e r

Der Einfluss der Ernährung
auf die Trypsinbildung im
Pankreas von Ratten

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Georg Maier
aus
München



München 1959

349/60

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München.

Referent: Privatdozent Dr. M. M. F o r e l l

Dekan: Professor Dr. H. S c h w i e g k.

Tag der mündlichen Prüfung: 1.12.1959

München 1959



Inhaltsverzeichnis:

Seite

Vorwort

A. ALLGEMEINER TEIL

I.	Einleitung	1
II.	Einteilung der Fermente	1-3
III.	Proteasen	3-4
IV.	Trypsingruppe	4-7
V.	Trypsinbestimmung	7
VI.	Methodische Durchführung	7-8

B. SPEZIELLER TEIL

I.	Trypsinbestimmung nach ANSON modifiziert zur Verwendung von Pankreas-homogenaten	10
	Trypsineichkurve	
II.	Untersuchungsergebnisse	18
III.	Besprechung der Untersuchungsergebnisse	23

Zusammenfassung 27

Literaturverzeichnis 29

Lebenslauf 31

A. ALLGEMEINER TEIL.

=====

I. Einleitung.

Die Erkennung der Bauchspeicheldrüsenerkrankungen gehörte immer schon zu den schwierigsten Problemen der Inneren Medizin. Wie KATSCH (1) 1938 durch eine Umfrage in Deutschland feststellen konnte, waren es nur einzelne Kliniker, die die Diagnose Pankreatitis häufiger stellten und auf die Miterkrankung bei anderen Krankheiten achteten, während in den meisten deutschen Kliniken, auch Universitätskliniken, die Pankreaserkrankungen noch eine Rarität waren. Diese Tatsache ist teilweise durch die verborgene Lage der Bauchspeicheldrüse selbst bedingt, weshalb sie der Palpation und Perkussion schlecht zugänglich ist, andererseits gab es wenig brauchbare Labormethoden, um die innere und äussere Sekretion der Drüse erfassen zu können. Zwanzig Jahre später schrieb KATSCH (2) in der kurzgefassten Diagnostik der Pankreaserkrankungen als Schlusswort: "Die Diagnose der Pankreaskrankheiten gilt noch immer als schwierig und wird noch immer häufig, bei chronischen Fällen jahrelang, verfehlt." Diese Schwierigkeit wird verständlicher, wenn wir uns die verschiedenen Funktionen der Drüse mit innerer und äusserer Sekretion vor Augen führen. Die innere Sekretion des Inselorgans, das LANGERHANS 1869 schon entdeckte, wollen wir nicht näher erörtern, sondern uns gleich den Fermenten zuwenden, die im exkretorischen Anteil der Drüse gebildet werden und über die Ausführungsgänge (ductus WIRSUNGIANUS und SANTORINUS) in den Darmtrakt gelangen.

II. Einteilung der Fermente. (3)

1. Hydrolasen; hydrolytische Spaltung der Substrate.

Allgemeine Reaktion: $AB + H_2O \rightleftharpoons A'OH + HB$

a) C-N Bindungen lösend:

aa) Desaminasen: Urease, Arginase, Histidase, Asparaginase, Hippuricase, Purindesaminasen, u. a. m.

bb) Proteasen: Proteinasen, Polypeptidasen, Dipeptidasen, Aminopeptidasen, Carboxypeptidasen.

- b) C-O Bindungen lösend:
- aa) Esterasen: Lipasen, Phosphatasen, u. a. m.
 - bb) Carbohydrasen: Amylasen, Glycosidasen, Hyaluronidasen, u. a. m.
 - cc) Nucleasen: Nucleophosphatasen, Nucleotidasen.
2. Phosphorylasen: phosphorolytische Spaltung der Substrate.
Allgemeine Reaktion: $AB + H_3PO_4 \rightleftharpoons A' \cdot O' \cdot PO_3H_2 + HB$
Glycogenphosphorylase
Saccharosephosphorylase
Nucleosidphosphorylase
3. Hydratasen: Wasserabspaltung und -addition.
Allgemeine Reaktion: $A + H_2O \rightleftharpoons H' \cdot A' \cdot OH$
Fumarase
Aconitase
Enolase
Carboanhydrase
4. Desmolasen: Lösung und Bildung von C-C Bindungen.
Allgemeine Reaktion:
- $$\begin{array}{ccc} C & - & C \\ OH & & \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{ccc} C & + & C \\ O & & H \end{array}$$
- a) Decarboxylasen: Abspaltung und Addition von CO₂.
Carboxylase
Brenztraubensäureoxydase
alpha-Ketoglutaräureoxydase
Aminosäurendecarboxylasen u. a. m.
- b) Aldolasen
5. Gruppenübertragende Fermente.
Allgemeine Reaktion: $AX + B \rightleftharpoons A + BX$
- a) Transphorylasen:
Hexokinasen
Myokinase
Mutasen u. a. m.
 - b) Transaminasen
 - c) Transamidinase (Kreatinsynthese)
 - d) Transmethylasen
 - e) Transacetylasen

- f) Transglycosidasen
 - g) Transpeptidasen
 - h) Transketolase und Transaldolase
6. Isomerasen;
Hexose- und Triosemerasen.
7. Fermente der Oxydoreduktion (Oxydoreduktasen)
- a) Oxydasen (metallhaltige Fermente):
 - Warburgsches sauerstoffübertragendes Ferment
 - Cytochrome
 - Peroxydase, Katalase
 - Phenoloxidasen
 - b) Dehydrasen
 - aa) mit Pyridinnucleotiden als Coencym
 - bb) mit Lactoflavinucleotiden als Coencym (gelbe Fermente) u. a. m.
 - c) Glyoxalase (Aldoketomutase).

Aus der ersten Gruppe der Hydrolasen greifen wir die für unsere Untersuchungen besonders wichtige Gruppe der Proteasen gesondert heraus und verfolgen deren weitere Aufgliederung.

III. Proteasen. (4)

Die Proteasen hydrolysieren die Peptidbindung:



Alle Fermente, welche auf Proteine und Peptide hydrolysierend wirken, fallen unter diese Gruppe.

1. Proteinasen, welche die Eiweisskörper selbst angreifen
2. Peptidasen, welche nicht auf die nativen Eiweisskörper, sondern nur auf Peptide einwirken.

Wichtige Proteinasen:

- a) Pepsin, im Magensekret, wirkt bei stark saurer Reaktion, spaltet Eiweisskörper zu Albumosen und Peptonen.
- b) Kathepsin, in den Zellen, wirkt bei schwach saurer Reaktion (pH 4-6)

- c) Trypsingruppe, im Pankreas, wirkt bei neutraler und alkalischer Reaktion (pH etwa 8) (Trypsin, Chymotrypsin)

IV. Trypsingruppe.

Das Trypsin wurde 1931 von NORTHROP (5) erstmalig kristallin dargestellt. Ebenso gelang es ihm, die inaktive Vorstufe Trypsinogen in Kristallform zu isolieren. In der ersten Hälfte des vorigen Jahrhunderts war die eiweißspaltende Fähigkeit des Pankreassekretes schon PURKINJE, PAPPENHEIM, BERNARD und CORVISART (6) bekannt. Der Name Trypsin stammt von KÜHNE aus dem Jahre 1867. Die Bildung des Trypsins erfolgt in der Bauchspeicheldrüse als inaktive Vorstufe, die als Trypsinogen bezeichnet wird. Es gelangt über den Ausführungsgang in das Duodenum. Hier erfolgt die Aktivierung durch einen speziellen Aktivator, die Enterokinase. Letztere wurde von PAWLOW und SCHEPOWALNIKOW erkannt. Ihr haben die beiden Forscher die spezifisch aktivierende Wirkung des Dünndarmsekretes zugeschrieben. Kinase wird gleichfalls im Pankreas produziert und liegt in inaktiver Form als Prokinase vor, erreicht auf dem Wege der äusseren Sekretion den Darm und geht dort in die wirksame Form über. Das Auftreten aktiver Kinase im Pankreas hätte durch die Bildung von aktivem Trypsin verheerende Folgen. Die sehr oft tödlich verlaufende Pankreasnekrose führt man auf Selbstverdauung des Pankreas zurück. Erschwerend bei der Erfassung der Trypsinwirkung muss der Umstand hervorgehoben werden, auf den 1936 KUNITZ und NORTHROP (7) schon hingewiesen haben, dass in ungereinigten Fermentsystemen, wie sie bei uns als Pankreashomogenate zur Verwendung kamen, Hemmungserscheinungen auftreten können durch den sogenannten Inhibitor (Trypsin-Inhibitor). NORTHROP gelang es, eine solche Trypsin-Inhibitor-Verbindung zu kristallisieren. Sie bestand zu 80 % aus Trypsin und zu 20 % aus dem Inhibitor. SHIRLEY, Mc. CANN und LASKOWSKI (8) haben den Trypsin-Inhibitor im Blutplasma bestimmt. Sie benutzten dazu die Methoden nach KUNITZ (9) in modifizierter Form und fanden einen nicht dissoziablen Komplex zwischen Trypsin und Blutplasma-Trypsin-Inhibitor. Für die Erklärung der chemischen Natur der Antitrypsin-Aktivität nahm HAYAKAWA (10) an, es handle sich bei der nicht eiweißhaltigen inhibitorischen Substanz um eine prosthetische Gruppe, während er das Serumprotein als "Träger" bezeichnete, sog. Symplex-Theorie. (1951) Ein Jahr später wurden von GREEN und WORK (11) aus Rinder-Pankreas-Inhibitor folgende Aminosäuren identifiziert: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Cystin, Threonin, Serin, Glykokoll, Alanin, Valin,

dem Pankreassaft ebenfalls in das Duodenum. Die Umwandlung des Chymotrypsinogens zum Chymotrypsin wird im Darm durch aktives Trypsin bewerkstelligt, im Gegensatz zum Trypsinogen, das durch aktives Trypsin nur bis zu einem gewissen Grade zu T.ypsin katalysiert werden kann. Die pH-Abhängigkeit des Aktivierungsvorganges ist die gleiche, wie sie für Trypsin zutrifft. Die Wirkung des aktiven T.ypsins bezieht sich in erster Linie auf genuine Eiweisse und zwar greift es solche Peptidbindungen an, an deren Bildung basische Aminosäuren, insbesondere Arginin beteiligt sind. Bei langer Einwirkungszeit werden Aminosäuren frei. Protamine werden ebenfalls gespalten. Lebende Gewebe, lebende Bakterien, lebende Askariden werden durch Trypsin nicht angegriffen. In lebenden Ascariden wurde gleichfalls schon ein Trypsin-Inhibitor aufgefunden. Neben dem eigentlichen Pankreas-trypsin kommt im Pankreas noch das Pankreaserepsin vor, das Peptone und Peptide zu Aminosäuren spaltet. Nicht zuletzt sei auf das ebenfalls im Pankreas produzierte stark blutdrucksenkende Kallikrein hingewiesen, das in der Drüse in seiner inaktiven Vorstufe als Kallikreinogen gespeichert wird. Auf dem Wege der äusseren Sekretion erreicht es den Darm und wird dort von aktiviertem Trypsin in die pharmakologisch wirksame Form des Kallikreins übergeführt. (21) Das von NORTHROP kristallisierte Trypsin hat ein Molekulargewicht von etwa 34 000. Die Zusammensetzung auf Grund der Elementaranalyse ergibt: C 50,2. H 6,6. N 16,13. S 1,1%. Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 7. Das Encym ist optisch aktiv, bei pH2 wird es durch kurzes Erhitzen auf 100 Grad Cels. denaturiert und unwirksam, kann aber beim Abkühlen dann wieder in der ursprünglichen Kristallform erhalten werden und gewinnt die volle Aktivität wieder zurück. Auf die praktische Bedeutung des Trypsins in der medizinischen Therapie sei noch kurz hingewiesen. So wird es beim traumatischen Hämothorax (22) intrapleural injiziert und beim Ulcus cruris (23) als Trockenpulver zur Anwendung gebracht. Die proteolytische Enzymwirkung wurde weiterhin noch zur Atelektasebehandlung (24) mittels Aerosolverabreichung ausgenutzt. Nicht nur das Trypsin selbst, sondern auch der Kallikrein-Inaktivator wird zu therapeutischen Zwecken benutzt, so insbesondere bei der acuten Pankreatitis. (25) Der Kallikrein-Inaktivator im Blutserum baut Kallikrein zum inaktiven Ferment um und schützt so den Organismus gegen das bei der Pankreasnekrose unphysiologisch frei werdende Kallikrein. Der vorerwähnte Kallikrein-Inaktivator wird aus Organen (Leber, Milz, Lymph- und Ohrspeicheldrüsen) von Rindern in grossen Mengen gewonnen. Ausser der Kallikrein-Inaktivierung (Aufhebung der Kreislaufwirkung,

ebenso Aufhebung der fermentativen Freilegung von Kallidin aus einer Serumglobulinfraktion) vermag er die proteolytische Wirkung des Trypsins und in etwa schwächerem Masse auch die des Chymotrypsins zu hemmen.

V. Trypsinbestimmung.

Die Bestimmung des Trypsins kann nach WILLSTÄTTER, WALDSCHMIDT-LEITZ (26) titrimetrisch unter Ausnützung der hydrolisierenden Wirkung des Fermentes auf Casein und Gelatine als Substrat in Anwesenheit von Enterokinase durchgeführt werden. Bei unseren experimentellen Untersuchungen haben wir die colorimetrische Methode der Trypsinbestimmung nach ANSON (27) in modifizierter Form angewandt. Eine weitere Methode zur Aktivitätsbestimmung von Pankreasproteasen wurde von PLACER 1955 (28) angegeben. Er verbindet das bisher zweistufige Verfahren der Abtrennung des unverdauten Eiweisses und die Filtratreaktion zur Bestimmung der Eiweisspaltstücke dadurch, dass er eine Kupfersuspension benützt, die durch Alkalisierung mit den proteolytisch freigesetzten Aminogruppen einen intensiv blau gefärbten Aminokupferkomplex bildet, der direkt photometrisch ausgewertet werden kann. Das Princip der Methode nach ANSON ist die colorimetrische Bestimmung des Tyrosins unter Verwendung des FOLIN-CIOCALTEAU'schen Reagens. Das Tyrosin wird beim Abbau von Rinderhämoglobin als Substrat durch Trypsin bei pH von 7,5 frei. Wichtig ist für vergleichende Messungen die strenge Einhaltung der Temperatur im Wasserbad bei 37 Grad Cels., sowie der Einwirkungszeit des Trypsins auf das abzubauen Substrat. Die colorimetrische Bestimmung führten wir am Beckmann'schen Spektrophotometer bei der Wellenlänge von 7 600 ANGSTRÖM-Einheiten durch unter Verwendung der 10 mm Quarzküvetten.

VI. Methodische Durchführung.

Trypsin und der zu untersuchende Aktivator werden eine bestimmte Zeit vorincubiert (10 Minuten) und nach Zusatz von 5 ml Substrat eine bestimmte Zeit (10-30 Minuten) im Wasserbad unter ständigem Schütteln bei 37 Grad Celsius verdaut. Dann wird tropfenweise 10 ml 0,3 n Trichloressigsäure zugegeben, während gut durchgeschüttelt wird, um den Verdauungsvorgang zu unterbrechen. Nach 10 Min. Stehen bei Zimmertemperatur wird filtriert und 5 ml des Filtrates werden mit 5 ml 0,5 n

NaOH versetzt und noch 3 mal des frisch zubereiteten Phenol-Reagens zugegeben. Zwischendurch muss das Filtrat und die Natronlauge jeweils gleichmässig durchgeschüttelt werden. Innerhalb einer bestimmten Zeit 2 - 10 Min. ist die Messung der so erhaltenen klaren blaugrünen Farblösung am BECKMANN'schen Spektrophotometer bei 7 600 Angströmeinheiten durchzuführen. Bei allen Untersuchungen ist die Bestimmung des Leerwertes vorzunehmen (Substrat ohne Trypsin). Die Leerwertbestimmung wird gegen aqua dest. vorgenommen.

Die Zubereitung des Substrates geschieht in folgender Weise: 2,2 g Rinderhämoglobin werden in 82 ml destilliertem Wasser in einem 250 ml Erlenmayerkolben aufgelöst und 36g Harnstoff zugegeben. Zuletzt werden 8 ml 1 n NaOH hinzugefügt. Diese Lösung wird im Wasserbad 10 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit werden noch 4 g Harnstoff zugegeben und 10 ml 1 m KH_2PO_4 . Nach Zubereitung der 1 m KH_2PO_4 -Lösung ist die Übersichtung mit Toluol notwendig. Bei unseren Untersuchungen wurde das Substrat jeweils frisch zubereitet.

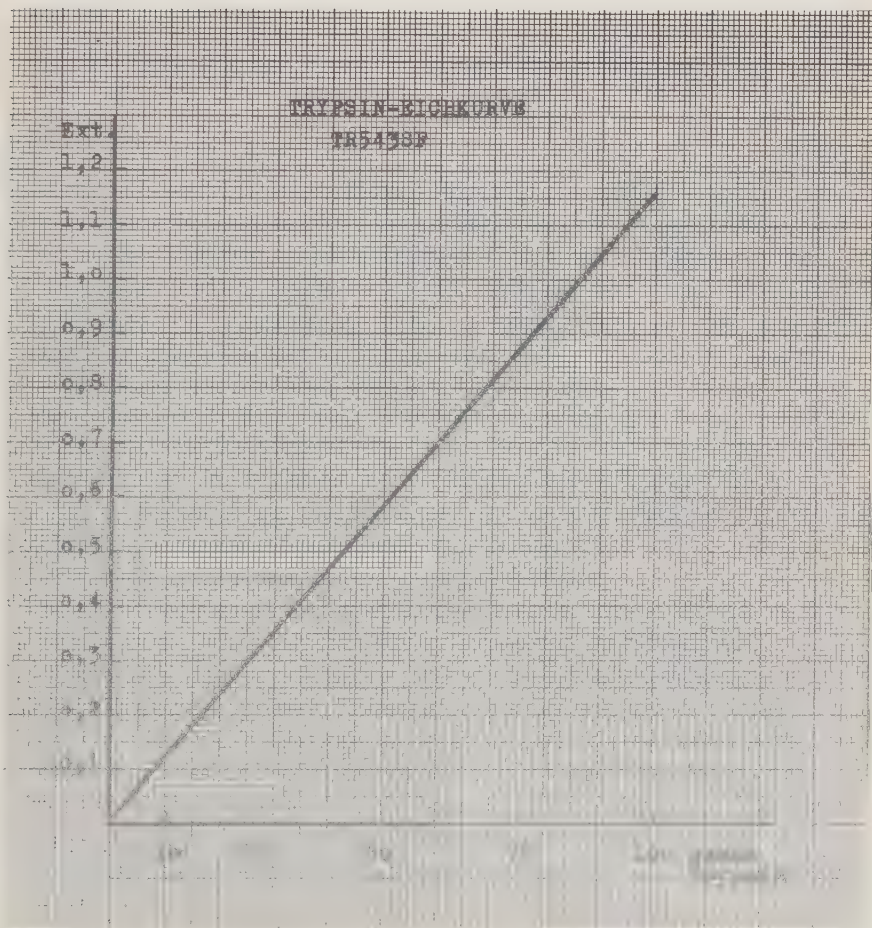
Die Herstellung des FOLIN-CIOLCALTEAU'schen Reagens gestaltete sich folgendermassen: Es werden zu 1 Teil des FOLIN-CIOLCALTEAU'schen Reagens noch 2 Teile aqua dest. hinzugefügt und gut durchmischt.

Die Leerwertsbestimmung wird gegen aqua dest. durchgeführt und die Hauptversuche gegen den Leerwert.

Bei sämtlichen Untersuchungen sind Doppelbestimmungen vorzunehmen.

Trypsin-Eichkurve.

Sie wurde hergestellt nach der vorangehend beschriebenen Methode unter Verwendung des Trypsins der Firma Worthington USA Charge TR 543 SF.



B. SPEZIELLER TEIL.

=====

I. Trypsinbestimmung nach ANSON modifiziert zur Verwendung von Pankreashomogenaten:

In einem Erlenmayerkolben (50 ml) wird zur Leerwertbestimmung 2 ml aqua dest. einpipettiert. In die folgenden Kölbchen wird zur Aufstellung der Eichkurve die frisch bereitete Trypsinlösung in verschiedenen Mengen (100 gamma je ml), bei den späteren Versuchen an deren Stelle Pankreashomogenate 0,1 ml bzw. Pankreashomogenate und Enterokinase 0,3 ml einpipettiert.

0,1 ml Trypsinlösung	(0,1 ml Stabpipette)
0,25 ml "	(0,5 ml ")
0,5 ml "	(0,5 ml ")
1,0 ml "	(1,0 ml ")

Damit die Ansätze immer gleiche Endvolumina aufweisen ist zur Konstanthaltung zu Beginn der Arbeiten aqua dest. in entsprechenden Mengen in die Kölbchen einzupipettieren je nach der zur Untersuchung verwendeten Menge Trypsin oder Pankreashomogenat bzw. Pankreashomogenat und Enterokinase. Z.B. bei Zugabe von 0,25 ml Trypsinlösung wird die entsprechende Menge aqua dest., das 1,75 ml zugegeben, entsprechend dem Leerwert von 2,0 ml aqua dest.

Jetzt nach der Trypsin- oder Pankreashomogenatzugabe bzw. Pankreashomogenat und Enterokinase die Lösung 10 Min. bei Zimmertemperatur vorincubieren. Nach Ablauf der Vorincubationszeit Zugabe von 5 ml Substrat. Kölbchen gut durchschütteln und ins Wasserbad bei 37 Grad C. geben. Automatische Schüttelung im Warburg.

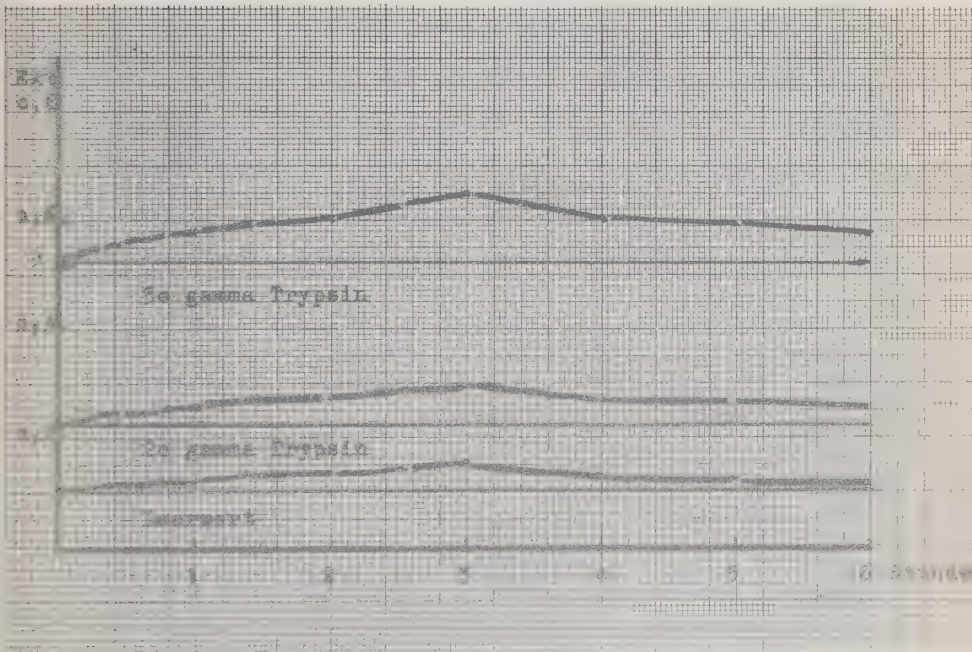
15 Minuten zur Verdauung im Wasserbad belassen.

Hierauf herausnehmen und tropfenweise Zugabe von 10 ml 0,3 m Trichloressigsäure unter gleichzeitigem Schwenken der Kölbchen.

Kölbchen bei Zimmertemperatur stehen lassen (Sedimentierung des gefällten Eiweisses). Sodann filtrieren. Rundfilter mit einem Durchmesser von 7 cm der Fa. Schleicher u. Schüll Nr. 587 E verwenden. 5 ml Filtrat mit 5 ml 1n NaOH versetzen, durchmischen und 3ml Folin-Ciocalteau'sches Reagens (1 Teil Reagens und 2 Teile aqua dest.) zugeben und nach 5 Minuten am Beckmann'schen Spektrophotometer bei 7600 Angström-Einheiten unter Verwendung von 10 mm Quarz-Küvetten messen.

Beobachtung der Änderung der Farbintensität nach Zugabe des Folin-Reagens in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Messung:

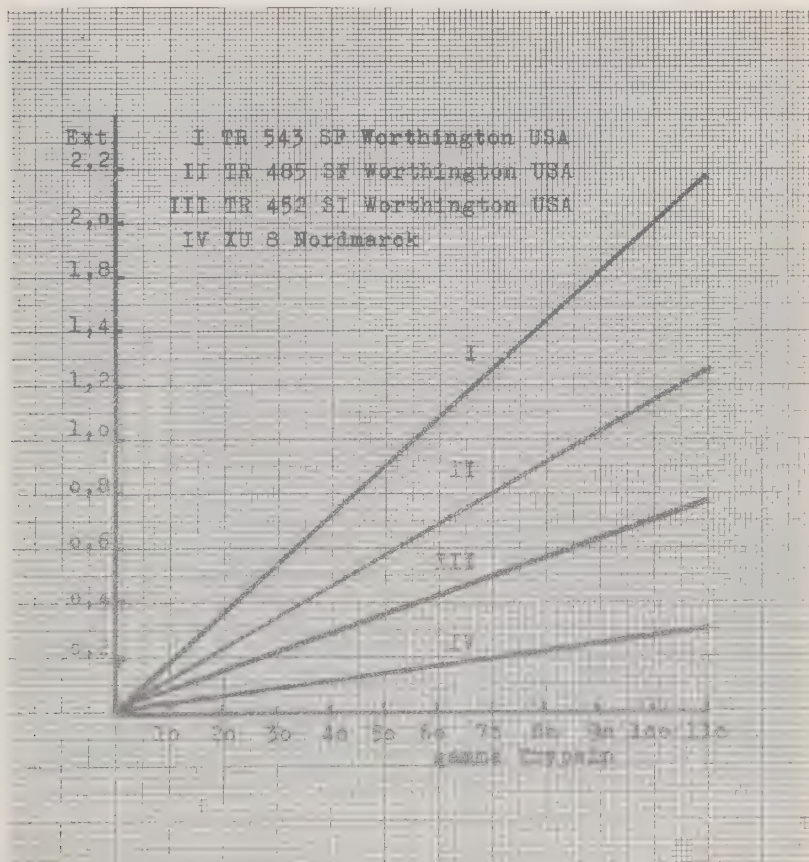
Die erste Messung wurde eine Minute nach Zugabe des Folin-Reagens ausgeführt, die weiteren Messungen folgten in drei-Minutenabständen, spätere Messungen in 15 und 30 Minutenabständen. Nach 6 Stunden wurde der Versuch abgebrochen. Kontrolliert wurde der Leerwert und zwei Ansätze mit verschiedenem Trypsingehalt. Es war aus den Kurven zunächst die Zunahme der Farbintensität feststellbar bis maximal nach drei Stunden die Farbintensität wieder abnahm.



Verhalten der tryptischen Aktivität verschiedener Trypsinpräparate:

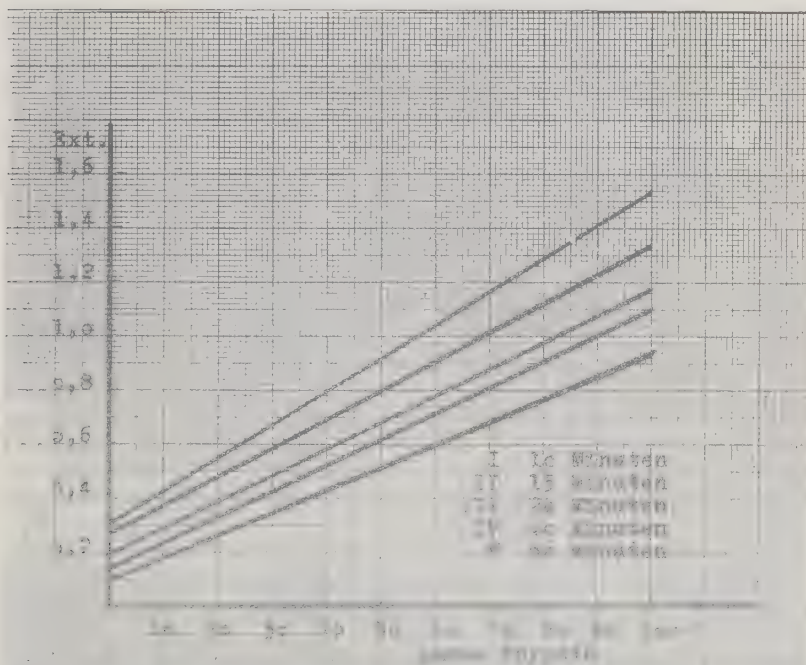
1. Kristallisiertes Trypsin der Firma Worthington USA
Nr. TR 543 SF
2. Kristallisiertes Trypsin der Firma Worthington USA
Nr. TR 485 SF
3. Kristallisiertes Trypsin der Firma Worthington USA
Nr. TR 452 SI
4. Kristallisiertes Trypsin der Firma Nordmarck Nr. XII 8

Es zeigt sich zwischen den einzelnen Trypsinsorten ein ganz beachtlicher Unterschied in der Aktivität. Wir haben zu unseren sämtlichen Untersuchungen das unter Nr. 1 genannte Trypsin verwendet.



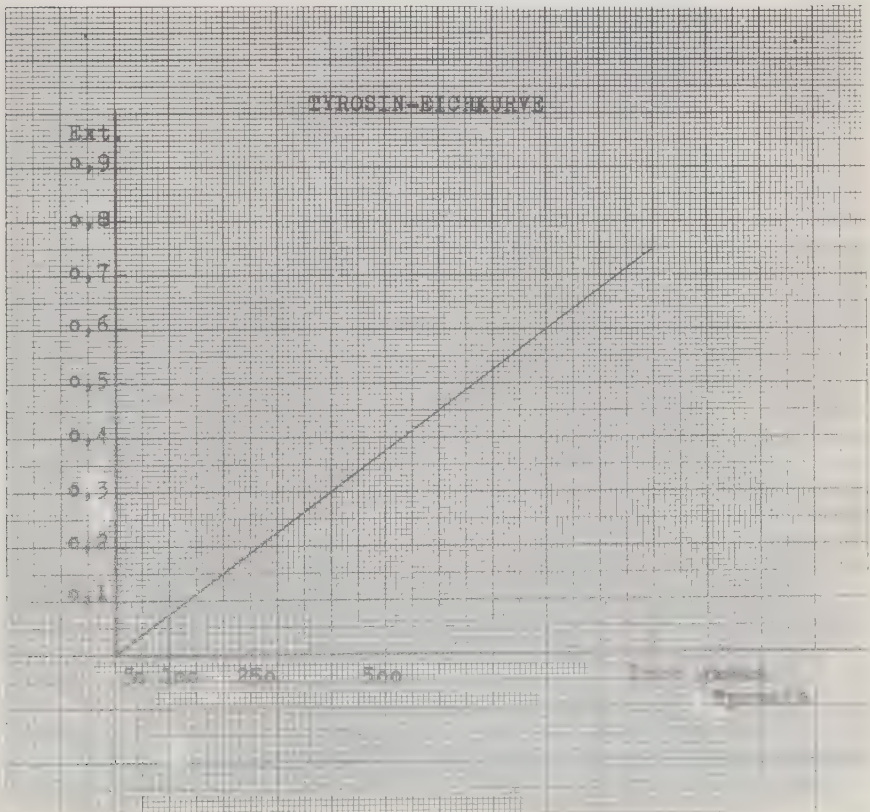
Einfluss der Verdauungszeit auf die Messergebnisse bezw. Tyrosinbildung:

Die Verdauungszeit im Wasserbad wurde zwischen 10 Minuten und 60 Minuten geprüft, bei sonst gleichen Bedingungen. Fünf Ansatzserien mit je einem Kontrollansatz wurden hergestellt. Jede Ansatzserie bestand ausser dem Kontrollansatz aus drei weiteren Ansätzen mit je 25 gamma, 50 gamma und 100 gamma Trypsin TR 543 SF. Als besonders günstig in Bezug auf den Leerwert und Kurvenverlauf unter Berücksichtigung der Messstufen am Beckmann'schen Spektrophotometer wählten wir für unsere Untersuchungen die Verdauungszeit von 15 Minuten.



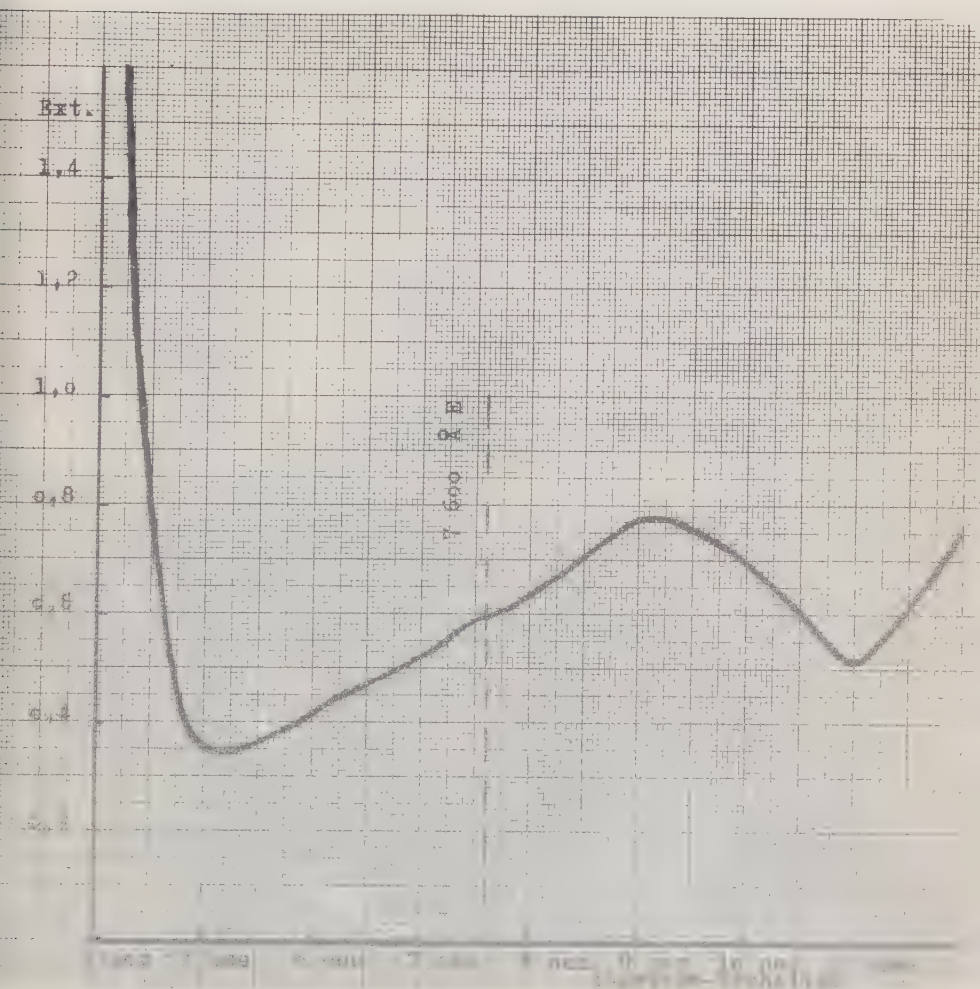
Tyrosin Eichkurve.

Da von verschiedenen Autoren (29) Untersuchungen der proteolytischen Aktivität vorgenommen und auf Tyrosin bezogen worden sind, so soll hier, um Vergleichsmöglichkeiten zu schaffen, eine entsprechende Tyrosin Eichkurve wiedergegeben werden. Sie wurde ebenfalls nach der modifizierten Anson'schen Methode angefertigt. Sie verhält sich, wie der Vergleich mit der Trypsin-Eichkurve zeigt, grundsätzlich genauso wie die Trypsinkurve. Beide weisen einen linearen Verlauf auf und gehen durch den Nullpunkt. Die Absolutwerte liegen selbstverständlich in verschiedenen Regionen.



Absorptionsspektrum des Tyrosins.

Messung am Beckmann'schen Spektrophotometer. Zur Verwendung kam eine Lösung, die im ccm 50 gamma Trypsin enthielt. Unsere späteren Untersuchungen wurden, wie auf der Kurve angegeben wurde, stets mittels der Wellenlänge 7 600 Angström-Einheiten durchgeführt.



Berechnung der zufälligen Fehler dieser Methode ohne Berücksichtigung methodischer oder persönlicher Fehler.

a) der Leerwerte

b) der Zypsinmesswerte (100 gamma/ml)

a) Leerwerte (22 Einzelversuche)

0,097	0,100
0,115	0,120
0,110	0,105
0,102	0,106
0,105	0,109
0,115	0,101
0,114	0,098
0,110	0,103
0,098	0,096
0,094	0,106
0,098	0,108

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} = \frac{2,310}{22} = 0,105$$

$$S^2 = \frac{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})}{n-1} = \frac{0,001\,032}{21} = 0,000\,049$$

$$s = \sqrt{S^2} = \sqrt{0,000\,049} = 0,007 = \pm 0,007$$

x = Einzelwerte

$\bar{x}$ = Mittelwert

n = Zahl der Einzelwerte

s = mittlere Streuung

b) Trypsinmesswerte (20 Einzelversuche)

1,160	1,165
1,086	1,115
1,100	1,185
1,103	1,196
1,210	1,140
1,185	1,205
1,160	1,172
1,103	1,180
1,200	1,158
1,170	1,165

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} = \frac{23,158}{20} = 1,158$$

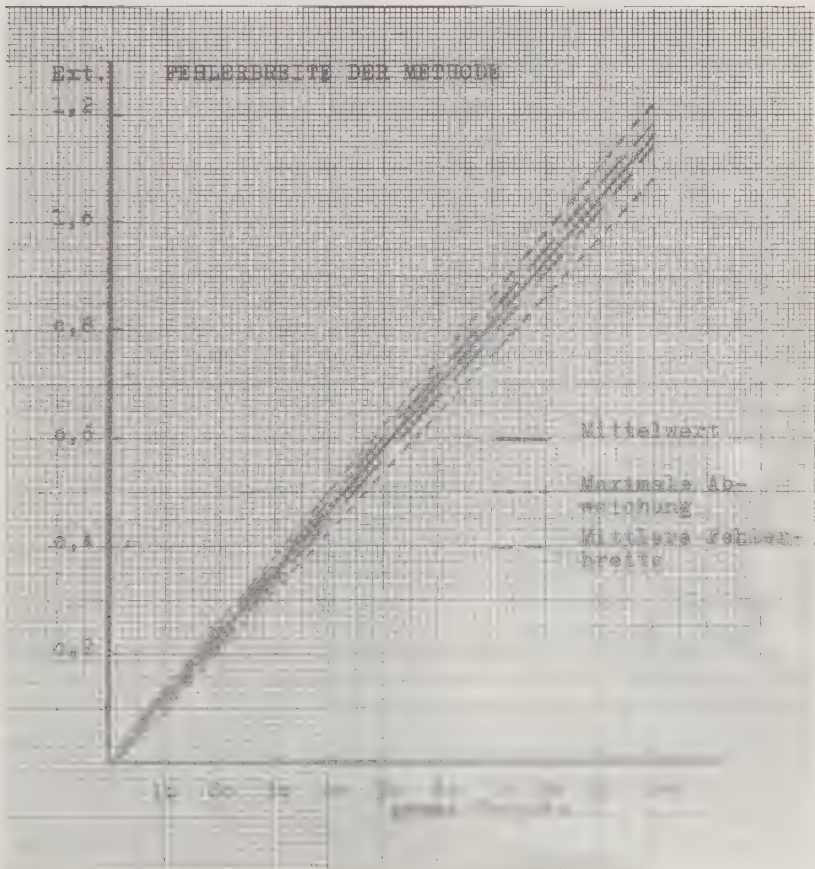
$$s^2 = \frac{(\bar{x} - x)^2}{n - 1} = \frac{0,020\ 231}{19} = 0,001\ 064$$

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{0,001\ 064} = 0,0\ 103 = \pm 0,0\ 103$$

Fehlerbreite der Methode.

Kurvenmäßige Darstellung.

- 1) Mittlere Fehlerbreite
- 2) Maximale Abweichung
- 3) Mittelwert



II. Untersuchungsergebnisse.

Gegenstand unserer Untersuchungen war ein kleiner Ausschnitt aus diesem grossen Arbeitsgebiet, nämlich die Untersuchung von Pankreashomogenaten bei Albinoratten mit gesunder Bauchspeicheldrüse im Hinblick auf ihre tryptische Aktivität unter Anwendung ganz bestimmter Diätformen (Normalkost, fettreiche und kohlehydratreiche Kost sowie eine eiweissreiche Kost, die wiederum in zwei Gruppen unterteilt wurde, wovon die eine Gruppe fast ausschließlich tierisches, die andere Gruppe pflanzliches Eiweiss erhielt). Diese Fütterungsversuche wurden in ähnlicher Form nur mit proteinreicher Diät und zum anderen mit Caseinhydrolysten von GROSSMANN und GREENGARD zusammen mit IVY (30) ausgeführt. Wir setzten unsere einzelnen Diätgruppen wie folgt zusammen:

	Zusammensetzung: I. Normalkost II. kohlehydrat- III. eiweissreiche		
	Kalorienzahl	reiche Kost Kalorienzahl	(pflanzliche Kost) Kalorienzahl
Casein	49,60	39,68	163,68
Gelatine	34,30	30,68	137,20
Salz	--,--	--,--	---,--
Hafermehl	211,75	--,--	---,--
Mondamin	170,14	242,54	54,30
Schweinefett	88,40	26,52	26,52
Hefe	8,72	10,85	10,85
Lebertran	27,06	22,55	22,55
Kal./100 g Diät	550,94	373,01	415,10
	IV. fettreiche V. eiweissreiche (tierisches		
	Kost Kalorienzahl	Eiweiss) Kost Kalorienzahl	
Casein	59,52	Hafermehl	128,20
Gelatine	51,54	Pferdefleisch	145,18
Salz	--,--		
Hafermehl	--,--		
Mondamin	--,--		
Schweinefett	477,36		
Hefe	11,99		
Lebertran	36,08		
Kal./ 100 g Diät	636,40	Kal./100 g Diät 273,38	

Der Kaloriengehalt je 100 g Nahrungsmittel beträgt:

Casein	496
Gelatine (trocken)	343
Mondamin	362
Schweinefett	884
Hefe	109
Lebertran	902
Hafermehl	385
Pferdefleisch mager	218

Es erhielt je Ratte pro Tag von der hier zusammengestellten Diät an Kalorien:

Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV	Gruppe V
112, 73	93, 25	103, 75	159, 10	82, 10

Die vorgelegte Nahrung wurde von den Tieren ganz aufgenommen, soweit sie hier aufgeführt werden.

Bei sämtlichen Untersuchungen wurden nur männliche Ratten des Stammes Sprague-Dawley mit einem Gewicht von 150-250 g verwendet. Manche Untersucher haben bei ähnlichen Untersuchungen je zur Hälfte weibliche und männliche Ratten (31) genommen.

Die Herstellung des Pankreashomogenates gestaltete sich folgendermassen: Nach Tötung der Tiere morgens nüchtern wurde sofort die Bauchspeicheldrüse herausgenommen und abgewogen. Es erfolgte dann die mechanische Zerkleinerung durch einen Homogenisator unter Zusatz von aqua dest. im Verhältnis 1 : 20 bei einer Temperatur von 0 Grad Cels. (im Eiswasserbad). Das Pankreashomogenat wurde, wie auch die Dünndarmenterokinase gleich nach der Aufbereitung im Eiswasserbad belassen bis zur baldigen Durchführung der Fermentbestimmung.

Die Darstellung der Enterokinase erfolgte ebenfalls durch Homogenisieren von Dünndarmmukosa eben getöteter gesunder und normal gefütterter Albinoratten. Es wurde hier zur Herstellung des Homogenates mit Wasser die Verdünnung von 1 : 10 gewählt. Die Dünndarmenterokinase benutzten wir zur Aktivierung des Pankreashomogenates. Hierüber wird später noch ausführlich berichtet werden.

Untersuchungsergebnisse der proteolytischen Aktivität der Pankreashomogenate mit Aktivierung durch Enterokinase bei den verschieden ernährten Albinoratten,

Gruppe I Normaldiät

Ratte Nr.	Diätanwendung	Homogenat mit Entero
45	1 Woche	0,940
6		0,840
5		0,880
598		1,110
156		0,990
39		0,980
552		0,984
531		0,750
538		1,200
541		1,200
		0,987 Mittelwert

Gruppe II kohlehydratreiche Kost

Ratte Nr.	Diätanwendung	Homogenat mit Enterok.
68	1 Woche	1,100
7		0,840
9		0,810
61		0,930
67		1,050
		0,946 Mittelwert
571	3 Wochen	1,030
533		0,930
88		0,810
201		0,950
196		0,850
		0,914 Mittelwert

Gruppe III eiweissreiche Kost (pflanzl.)

Ratte Nr.	Diätanwendung	Homog. mit Enterok.
176	1 Woche	1, 15o
158		1, 25o
4		1, 38o
597		1, 23o
596		1, 13o
		1, 23o Mittelwert
177	3 Wochen	1, 35o
128		o, 965
4o		1, 37o
554		o, 93o
535		1, o3o
		1, 129 Mittelwert

Gruppe IV fettreiche Kost

Ratte Nr.	Diätanwendung	Homog. mit Enterok.
179	1 Woche	1,070
166		0,860
165		1,040
69		0,750
8		0,548
		0,853 Mittelwert
218	3 Wochen	0,720
182		1,030
70		1,000
573		0,725
537		0,754
		0,846 Mittelwert

Gruppe IV fettreiche Kost

Ratte Nr.	Diätanwendung	Homog. mit Enterok.
204	6 Wochen	1,200
205		1,250
18		0,710
17		0,750
		0,985 Mittelwert

Gruppe V eiweissreiche (tierische) Kost

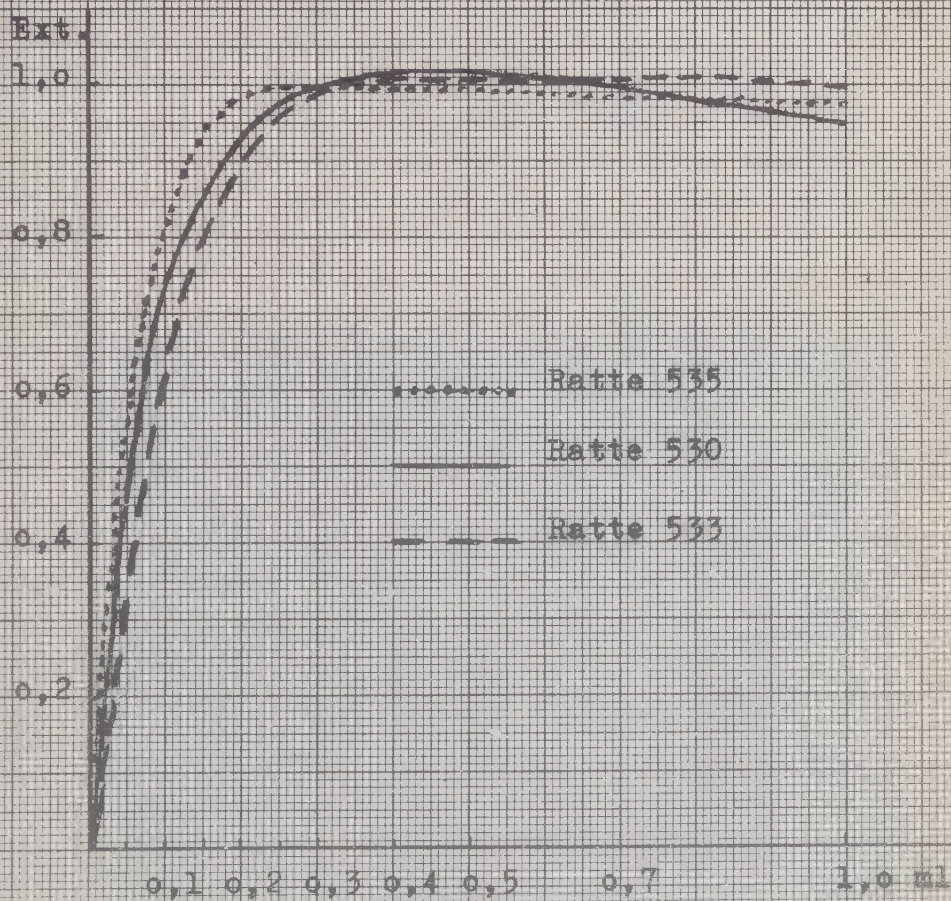
Ratte Nr.	Diätanwendung	Homog. mit Enterok.
163	1 Woche	1,820
162		1,800
161		1,850
34		1,100
125		2,000
		1,714
81	3 Wochen	1,650
82		1,700
150		1,700
151		1,455
27		1,350
		1,571 Mittelwert

Besprechung der Untersuchungsergebnisse:

Bei der Betrachtung der proteolytischen Aktivität, wie sich die Untersuchungsergebnisse bei der photometrischen (colorimetrischen) Bestimmung am Beckmann'schen Photometer (Extinktion) darstellten, fielen deutliche Unterschiede bei den einzelnen Diätformen auf. Wir errechneten aus dem Mittelwert bei den einzelnen Diätgruppen den Gehalt an Trypsin, der in der Bauchspeicheldrüse vorhanden war unter Zuhilfenahme unserer Trypsineichkurve.

Der colorimetrische Wert am Beckmann'schen Spektrophotometer ergab bei den Pankreashomogenaten der normal ernährten Albinoratten der Diätgruppe I einen Mittelwert von 0,987, das entspricht auf der Eichkurve dem Trypsinwert von 85 gamma. Wir verwendeten zur Durchführung der ANSON'schen Methode 0,1 ml des Pankreashomogenates, das entspricht dem Gewicht von 0,005 g Frischdrüse, da das Pankreashomogenat aus der Frischdrüse unter Zugabe von aqua dest. im Verhältnis 1 : 20 zubereitet worden ist. Damit errechnet sich der Trypsingehalt je mg Bauchspeicheldrüse bei den Kontrolltieren (Mittelwert) der Normaldiät Gruppe I zu 17 gamma Trypsin.

Um die Zugabe der optimalen Menge von Enterokinase (Dünndarmmukosahomogenat) zum Pankreashomogenat, um die völlige Umwandlung des Trypsinogens zu Trypsin während der Inkubationszeit zu erreichen, führten wir eine eigene Versuchsreihe durch und stellten eine Kurve der jeweiligen Untersuchungsergebnisse her, aus der die Aktivität dieses Stoffes zu ersehen ist. Wir konnten unter Verwendung ganz verschiedener Dünndarmmukosahomogenate - gewonnen aus Ratten der Versuchsgruppe I Normaldiät - mit ganz bestimmten Mengen (ab 0,3 ml) immer wieder bei Verwendung ein und desselben Pankreashomogenates die optimale, gleich hoch bleibende Trypsinaktivierung herausfinden. Dabei fiel auf, dass selbst durch Zugabe grösserer Enterokinasegaben 1 ml und darüber, keine weitere Steigerung der tryptischen Aktivität aus den Pankreashomogenaten mehr herauszuholen war.

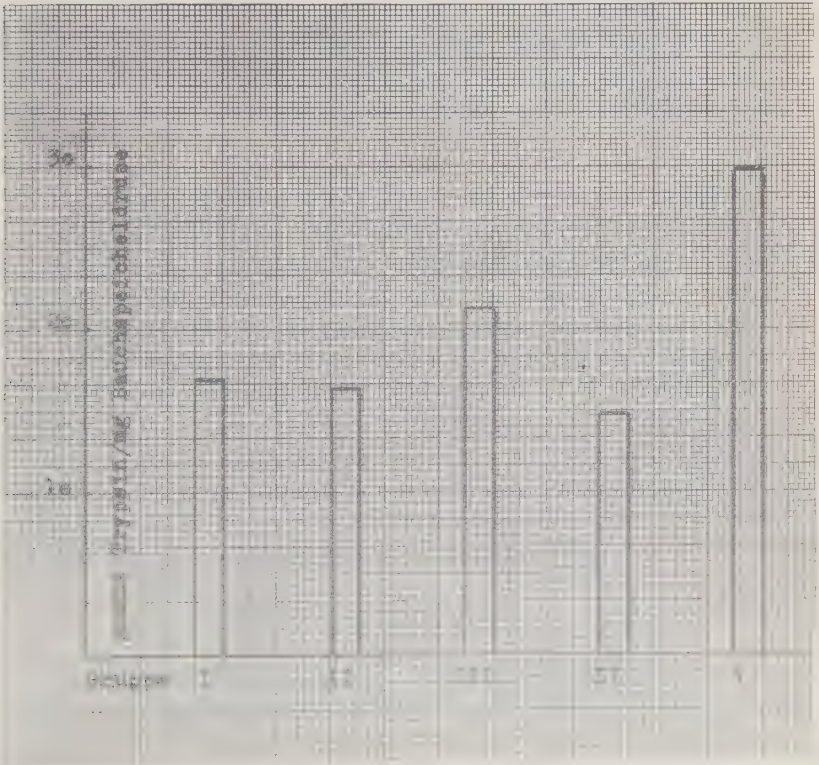


Bei allen unseren Untersuchungen incubierten wir deshalb die Pankreashomogenate (0,1 ml) mit der optimalen Menge 0,3 ml Enterokinaselösung. Wie eingangs schon erwähnt worden ist, handelt es sich bei dem Dünndarmmukosahomogenat um eine 10%ige Suspension in Wasser.

Nachstehend geben wir eine kurze Übersicht über die erzielten Untersuchungsergebnisse bei den einzelnen Diätformen.

Die Zahlen bedeuten gamma Trypsin je mg Frischdrüse.

Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV	Gruppe V
17,0	16,4	21,4	14,8	29,8 (1.Woche)
	15,8	19,4	14,6	27,2 (2.Woche)
			17,0	(6.Woche)



Der Gesamtgehalt im Pankreas an durch Enterokinase aktivierbarem Trypsin lässt bei den Tiergruppen, die mit eiweissreicher Kost gefüttert wurden, auf den ersten Blick den höchsten Gehalt dieses Fermentes in der Bauchspeicheldrüse erkennen. Bezogen auf die normal ernährten Tiere der Gruppe I ist die Steigerung gerade bei Gruppe V mit Fleischnahrung nach einer Woche Fütterungszeit mit 75 % Mehrgehalt an proteolytischem Ferment zu beziffern. Die Gruppe III der mit vornehmlich Pflanzeneiweiss ernährten Tiergruppe bleibt gegenüber der Gruppe V deutlich zurück, steht aber mit 21,4 gamma Gesamttrypsin/mg Frischdrüse deutlich über der Kontrollgruppe I mit 17,0 gamma Ges. Trypsin/mg Frischdrüse. Interessant ist auch zu erwähnen, dass keine der übrigen Gruppen II und IV den Fermentgehalt der Gruppe I erreichten. Sie blieben mit 16,4 bzw. 14,8 gamma Ges. Trypsin je mg Bauchspeicheldrüse nach Ablauf der ersten Fütterungsperiode gegenüber 17,0 gamma der Normalgruppe zurück. Bei der zweiten Fütterungsperiode nach drei Wochen erwiesen sich die Untersuchungsergebnisse der Gruppe II und IV praktisch unverändert. Die Gruppe I mit Normalkost war nicht über die erste Woche hinaus verfolgt worden, da von vorneherein anzunehmen war, dass sich keine Änderung der proteolytischen Fermente im Pankreashomogenat ergeben würde.

Diese Untersuchungen stimmen mit den in anderer Form von GROSS-MANN et al. (29) vorgenommenen Experimenten überein. HONG und MAGIE haben (30) die proteolytischen Pankreasfermente bei Ratten noch durch Zugabe von verschiedenen Aminosäuren zu einer 7 % Casein enthaltenden Diät überprüft und die Feststellung treffen können, dass die Zufuhr von 1 % Threonin mit der vorerwähnten Nahrung die Fermentaktivität deutlich senkt, demgegenüber die Zufuhr von 1 % L-Arginin die proteolytische Aktivität des Pankreas signifikant steigert. MAGEE und ANDERSON (31) konnten weiterhin das Verhalten des Fermentspiegels bei eiweissreicher Kost an Rattenpankreas zeigen und sahen zunächst in den ersten Tagen einen Anstieg der Proteasenkonzentration, die aber nach 6 Tagen bereits wieder im Abnehmen begriffen war.

ZUSAMMENFASSUNG:

Im Pankreas verschieden ernährter Albino-Ratten wurde der Trypsingehalt festgestellt. Gruppe I erhielt eine normal zusammengesetzte Kost, Gruppe II eine kohlehydratreiche Kost, Gruppe III eine eiweissreiche pflanzliche Kost, Gruppe IV eine fettreiche Kost und Gruppe V eine an tierischem Eiweiss reiche Kost. Zur Trypsinbestimmung im Pankreas wurde die Methode nach Anson modifiziert. Die Umwandlung des im normalen Pankreas inaktiv vorliegenden Trypsinogens zu proteolytisch wirksamen Trypsin gelang durch die Zugabe von Enterokinase, die aus der Dünndarmmukosa von Ratten hergestellt wurde. Es liess sich zeigen, dass die eiweissreich ernährten Tiere erhöhte Trypsinwerte im Pankreas aufwiesen. Die größte Steigerung ergab sich bei den mit tierischem Eiweiss ernährten Ratten mit 71 % gegenüber den normal ernährten Tieren. Die mit Pflanzeneiweiss gefütterten Tiere zeigten keinen so deutlichen Anstieg, während die kohlehydratreich und fettreich ernährten Tiergruppen sogar unter dem Durchschnitt der normal ernährten Tiere lagen.

An dieser Stelle sei es gestattet, Herrn Priv.Do. Dr. med. M. M. F O R E L L der II. Medizinischen Klinik der Universität München meinen verbindlichsten Dank auszusprechen für die Überlassung dieser Arbeit und für die Beratung.

Herrn Prof. Dr. phil., Dr. med. E. W E R L E , Leiter des wissenschaftlichen Laboratoriums der Chir. Klinik der Universität München möchte ich meinen ganz besonderen Dank aussprechen für die freundliche Zuweisung eines Arbeitsplatzes in seinem Laboratorium zur praktischen Durchführung dieser Arbeit und die jederzeit gewährte gütige Unterstützung.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Katsch: Hdb. d. inn. Med., 4. Aufl., Bd. III/2
2. Katsch: Kurzgefasste Diagnostik d. Pankreaserkrankungen (1958)
3. Hoffmann-Ostenhoff: Adv. Enzymol 14, 219 (1953)
4. Leuthardt: Lehrbuch der phys. Chem. (1958)
5. Northrop, J. H.: J. Gen. Phys. 16, 267 (1932)
6. Purkinje, Pappenheim (1936) Zit. n. Oppenheimer Fermente 2, 894.
7. Kunitz, M., Northrop, J. H.: J. gen. Phys. 19, 991 (1936)
8. Shirley, F., Mc. Cann and M. Laskowski: J. of Biol. Chem. 204, 1 (1953)
9. Kunitz, M.: J. gen. Physiol. 30, 291 (1947)
10. Hayakawa, M. Tohoku J. Exper. Med. 53, 283 (1951)
11. Green, N. M., Work, E.: Chem. Zentralbl. Nr. 7 123 (1952)
12. Frey E. K., Kraut, H., Werle, E.: Monographie Padutin (Kallikrein) (1952)
13. Werle, E., Maier, L., Ringelmann, R.: Naturwissenschaften 39, 328 (1952)
14. Werle, E., Appel, W.: Intern. Physiologenkongress Brüssel 1956.
15. Grassmann: Handb. d. phys. Chem. (1951)
16. Wohlgemuth; J. Handb. Biochem. Erg. 2, 328 (1934)
17. Grenngrad, H. J. W., Stein and Ivy, A. C.: Am. J. Physiol. 133, 121 (1941)
18. Agren, G.: J. Physiol. London 90, 330 (1937)
19. Diomond und Siegel: Am. J. Digest. Dis. a. Nutr. 7, 435 (1950)

20. Northrop, J.H.: Kristalline Enzymes New York, 1947
21. Frey E.K., Kraut, H., Werle, E.: Klin.Wschr.(1932) 846
22. Delannoy, E. und Ribet, M.: Presse méd. 61, 97 (1953)
23. Madden, J.F., Ravits, H.G.: J.am.Med.Ass.149, 1616 (1952)
24. Craven, J.F.: J. Pediatr. 42, 228 (1953)
25. Werle, E., Tauber, K.T., Hartenbach, W. und Forell, M.M.:
Mch.Med.Wochschr. 35, 1265 (1958)
26. Willstätter, R-E., Waldschmidt-Leitz:
Zentr.Bl.d.phys.Chem. 161 (192)
27. Anson, M.L.: J.gen.Physiol.22, 79 (1938)
28. Placer, Z.: Rev.Czechoslovak. Med.1, 126
(1955)
29. Grossmann, M.I.H., Grenngard and Ivy A.C., Am.J.Physiol.
141, 38 (1944)
30. Hong, S.S., Magee, D.F.: Am. J. Physiol.191, 1 Oct.57
31. Magee D.F., Anderson, E.G.: Am.J.Physiol. 180, 3.Mar.55

LEBENS L A U F

=====

Als Sohn der Landwirtseheleute Josef und Anna M a i e r , geborene Lackner, wurde ich am 2.4.1922 in Kirchasch Ldkrs. Erding/Obb. geboren. Nach Besuch der Volksschule trat ich 1936 in die Aufbauschule für Jungen in Freising ein und erhielt dort am 31.1.1941 den Reifevermerk, da ich am 5.2.1941 zum Reichsarbeitsdienst eingezogen wurde. Nach drei Monaten RAD erfolgte die Überstellung zur Deutschen Wehrmacht. 1944 wurde ich dann als Kriegsversehrter vorzeitig aus dem Wehrdienst entlassen. So konnte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München im Wintersemester 1944/45 das Medizinstudium aufnehmen. Die ärztliche Vorprüfung legte ich 1947 ab und unterzog mich am 18. August 1950 der ärztlichen Prüfung mit der Note "Sehr gut". Anschliessend erweiterte ich meine Kenntnisse an der Universitäts-Kinderklinik in München (11.2.1951 bis 15.2.1952) und begab mich dann am 15.2.1952 zur weiteren Fachausbildung an die I. Medizinische Klinik der Universität in München.

